

0005055974

WPI Acc no: 1990-038584/199006

Lubricant additives and compsns. - prepd. from triglyceride or wax ester of vegetable oils and sulphur and phosphite derivs.

Patent Assignee: INT LUBRICANTS INC (ITLU-N)

Inventor: ANDERSON R E; ERICKSON F L; LANDIS P S

Patent Family (17 patents, 21 & countries)

Patent Number	Kind	Date	Application Number	Kind	Date	Update	Type
EP 353872	A	19900207	EP 1989306903	A	19890706	199006	B
AU 198938201	A	19900125				199010	E
BR 198903507	A	19900417				199020	E
ZA 198905148	A	19900425	ZA 19895148	A	19890706	199022	E
US 4925581	A	19900515	US 1988221061	A	19880719	199024	E
			US 1988282014	A	19881209		
JP 2153994	A	19900613	JP 1989183825	A	19890718	199030	E
CN 1039438	A	19900207				199045	E
US 4970010	A	19901113	US 1988221061	A	19880719	199048	E
			US 1988282014	A	19881209		
US 5023312	A	19910611	US 1988221061	A	19880719	199126	E
			US 1988282014	A	19881209		
			US 1990510942	A	19900819		
AU 199182741	A	19911024				199150	E
EP 353872	B1	19930407	EP 1989306903	A	19890706	199314	E
IL 90831	A	19930221	IL 90831	A	19890630	199314	E
DE 68905879	E	19930513	DE 68905879	A	19890706	199320	E
			EP 1989306903	A	19890706		
AU 639131	B	19930715	US 1991634880	A	19910110	199335	E
			AU 199182741	A	19910827		
US 5282989	A	19940201	US 1988221061	A	19880719	199406	E
			US 1988282014	A	19881209		
			US 1990606522	A	19901031		
			US 1992899219	A	19920616		
CA 1336426	C	19950725	CA 604929	A	19890706	199537	E
KR 131454	B1	19980414	KR 198910130	A	19890718	200011	E

Priority Applications (no., kind, date): US 1988221061 A 19880719; US 1988282014 A 19881209; US 1990510942 A 19900819; US 1990606522 A 19901031; US 1992899219 A 19920616

Patent Details

Patent Number	Kind	Lan	Pgs	Draw	Filing Notes
EP 353872	A	EN	15	0	
Regional Designated States,Original	AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE				

BR 198903507	A	PT				
ZA 198905148	A	EN				
US 4925581	A	EN	9			
US 4970010	A	EN	7			
US 5023312	A	EN	10			
EP 353872	B1	EN	16	0		
Regional Designated States,Original	AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE					
IL 90831	A	EN				
DE 68905879	E	DE			Application	EP 1989306903
					Based on OPI patent	EP 353872
AU 639131	B	EN			Division of application	US 1991634880
					Previously issued patent	AU 9182741
US 5282989	A	EN	7	0	C-I-P of application	US 1988221061
					Division of application	US 1988282014
					Continuation of application	US 1990606522
					C-I-P of patent	US 4925581
					Division of patent	US 4970010
CA 1336426	C	EN				

Alerting Abstract EP A

Lubricant compsn. contg. base and additive (I). (I) is deriv of vegetable-oils and is a mixt. of at least 2 ingredients from 3 classes. Class 1= triglyceride and/or wax-ester of a vegetable-oil. Class 2= sulphurised vegetable-oil wax ester derived from 18-22 unsatd. acid and alcohol and/or jojobo-oil (25-75%, pref. 50%) and sulphurised triglyceride vegetable-oil pref. with at least 2 double-bonds and 30-60 straight chain length (25-75%, pref. 50%).

Class 3= phosphite-adduct of vegetable-oil wax ester and/or triglyceride (II) with at least 90% of fatty-acids in the oil contg. 16-26 atoms and 1-3 double bonds. Pref. (II) is a mono, di, tri, tetra, penta or hexa-adduct of oil with (RO)₂-RO-H, where R= 4-8C alkyl, alkaryl, aralkyl or cycloalkyl. Pref. oils are meadowfoam, rapeseed and crambe oils.

A process for sulphurising triglyceride vegetable oils uses pref. 12-20 wt.% sublimed S added to oil and reacted at 180-200 deg.C for 2.5 hours.

ADVANTAGE - Compsns. are prepd. using relatively abundant vegetable oils without resorting to multiple processing-steps.

Equivalent Alerting Abstract US A

Lubricating compsn. consists of a lubricant base and a lubricant additive selected from (i) triglyceride meadowfoam oil and/or a wax ester of meadow form oil; (ii) a sulphurised meadowfoam oil wax ester and/or sulphurised triglyceride meadowfoam oil; and/or (iii) phosphite adduct of tryglyceride meadowfoam oil and/or a phosphite adduct of meadowfoam oil wax ester.

ADVANTAGE - The lubricant has anti-friction properties, including antiwear and load-carrying properties.

ADVANTAGE - (9pp)

Equivalent Alerting Abstract US A

Lubricant additive comprises a mixed sulphurised triglyceride vegetable oil in which 25-75% by wt.

triglyceride vegetable oil is mixed with 75-25 wt.% of an unsatd. wax ester and sulphurised ester. The unsatd. wax ester has at least 2 double bonds and 30-60C straight chain length. The wax ester is derived from an unsatd. fatty acid and an unsatd. fatty alcohol, or the wax ester is jojoba oil.

ADVANTAGE - Lubricant additive is provided that can use relatively abundant supplies of vegetable oils without resorting to multiple processing steps.

ADVANTAGE - (7pp)

Equivalent Alerting Abstract US A

Lubricant additive comprises a phosphite adduct of triglyceride meadowfoam oil. The phosphite adduct is a mono-, di-, tri-, tetra-, penta- or hexa- adduct of the reaction prod. of (RO)₂-PO-H and triglyceride meadowfoam oil. In the formula, R is H, 1-12C alkyl, 1-12C aryl, 1-12C alkaryl, 1-12C aralkyl or cyclo-(4-12C)-alkyl. The phosphite adduct is pref. attached to the triglyceride meadowfoam oil at a C-C double bond.

USE/ADVANTAGE - Antifriction lubricating additive is used with cutting fluids, precoat oils, metal working oils, automatic transmission fluids, gear oils, way lubricants, greases, aviation oils, textile lubricants, hydraulic oils, circulating oils, steam cylinder oils, spindle oils, fire resistant fluids and automotive and marine oils.

USE/ADVANTAGE - (10pp)

Equivalent Alerting Abstract US A

The compsn. comprises a lubricant base and an additive which comprises a mixt. of two ingredients of a) triglyceride vegetable oil, wax ester of a triglyceride vegetable oil and combinations; b) sulphurised mixt. of 25-75% triglyceride vegetable oil and 25-75% wax ester of triglyceride vegetable oil, where the ester is derived from a 18-22 C unsatd. acid and a 18-22 unsatd. alcohol or of Ca. 25-75% jojoba oil; and c) phosphite adduct of triglyceride vegetable oil, phosphite adduct of wax ester and combinations, if at least 90% of the fatty acids of the oil are pref. 16-26C and have at least 1 and no more than 3 double bonds.

The lubricant base is of automobile engine or precoat oil, gear or textile lubricant etc. A lubricant additive is claimed.

ADVANTAGE - Lubricant additive compsns. are prepd. using relatively abundant supplies of vegetable oils without resorting to multiple processing steps of mfg. wax esters of fatty acids.

⑫ 公開特許公報(A) 平2-152994

⑤Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬公開 平成2年(1990)6月12日

C 07 K 15/12
A 61 K 39/395
43/00L 8318-4H
8829-4C
8829-4C※

審査請求 未請求 請求項の数 29 (全17頁)

⑭発明の名称 効果が増強された細胞障害剤

⑰特 願 平1-46392

⑱出 願 平1(1989)2月27日

優先権主張 ⑲1988年2月26日⑳米国(US)㉑161174

⑳発 明 者 ボール ジー・エイブ アメリカ合衆国, ワシントン98121, シアトル, 1602, フ
ラムズ アーストアベニュー2125

㉑発 明 者 アルトン チャールズ アメリカ合衆国, ワシントン98020, エドモンズ, ドリフ
モーガン, ジュニア トウッド ブレイス803

㉒出 願 人 ネオルツクス コーポ アメリカ合衆国, ワシントン98119, シアトル, ウェスト
レイション ハリソン ストリート410

㉓代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

効果が増強された細胞障害剤

2. 特許請求の範囲

1. 開裂性リンカーを介してヒト又は哺乳動物
宿主内の標的部位に特異的な標的指向タンパク質
に結合した感作剤を含んで成る複合体。

2. 前記感作剤が、細胞毒又は放射線の細胞障
害効果を増強する薬剤である請求項1に記載の複
合体。

3. 前記感作剤が、ブチオニンスルホキシミン、
カルシウムチャンネルブロッカー、メトロニダゾ
ール、ミソニダゾール、ジルチアゼム、2-(置
換スルファミル)-6-ニトロベンゾエート、2-
(置換スルファミル)-6-ニトロベンズアミ
ド、3-ニトロピラジンの2, 6-二置換誘導体、
イソインドレジオン化合物、ドキソルビシン、ブ
レオマイシン、シス-ジアミノジクロロ白金、
WR2721及びそれらの誘導体からなる群より選択さ
れたものである請求項3に記載の複合体。

4. 前記感作剤が、DNA修復を阻害する薬剤
である請求項2に記載の複合体。

5. 前記標的タンパク質が、癌細胞に特異的な
モノクローナル抗体若しくはその断片である請求
項1, 2, 3又は4に記載の複合体。

6. 前記標的指向タンパク質が抗体であり、前
記複合体が同一の抗体分子に結合した細胞障害剤
を更に含んで成る請求項1に記載の複合体。

7. 標的細胞及び非標的細胞を感作剤と細胞障
害剤の両方に接触させることを含んで成る非標的
細胞に比較して標的細胞に対する細胞障害剤の細
胞障害効果を特異的に増加させる方法において、
前記感作剤又は細胞障害剤の少なくとも一つが標
的細胞に特異的な標的指向タンパク質に結合して
おり、感作剤又は細胞障害剤の生物活性が標的指
向タンパク質からの放出により増強される場合に
標的指向タンパク質と感作剤若しくは細胞障害剤
又はその両方の間の結合が標的部位で開裂する、
ことを特徴とする方法。

8. 前記標的指向タンパク質が、癌細胞に特異

的なモノクローナル抗体又はその断片である請求項7に記載の方法。

9. 前記感作剤が、ブチオニンスルホキシミン、カルシウムチャンネルブロッカー、メトロニダゾール、ミソニダゾール、ジルチアゼム、2-(置換スルファミル)-6-ニトロベンゾエート、2-(置換スルファミル)-6-ニトロベンズアミド、3-ニトロピラジンの2,6-二置換誘導体、イソインドレジオン化合物、ドキソルビシン、ブレオマイシン、シス-ジアミノジクロロ白金、WR2721及びそれらの誘導体からなる群より選択されたものである請求項7に記載の方法。

10. 前記感作剤がDNA修復を阻害する薬剤であり、前記細胞障害剤が標的細胞に特異的な抗体に結合した治療用放射性核種である請求項7に記載の方法。

11. 前記感作剤がブチオニンスルホキシミンであり、前記細胞障害剤が標的細胞のグルタチオンレベルが上昇すると増強又は回復する細胞障害活性を有する薬剤である請求項9に記載の方法。

障害効果を減少させる方法。

17. 前記複合体が、保護剤として式 $H_2N-(CH_2)_2-NH-(CH_2)_2-SPO_3R_2$ で表されるWR2721と称される薬剤を含んで成る請求項16に記載の方法。

18. 前記標的細胞が、骨髓幹細胞に結合するモノクローナル抗体である請求項17に記載の方法。

19. 前記細胞障害剤が、標的細胞に結合する抗体に結合した治療用放射性核種である請求項第17又は18に記載の方法。

20. 非標的細胞を薬剤WR2721又はその誘導体と接触させた後、標的指向タンパク質に結合した治療用放射性核種を含んで成る複合体に暴露することを含む、前記複合体の非標的細胞に対する細胞障害効果を減少させる方法。

21. 前記複合体が、癌細胞に結合するモノクローナル抗体に結合した放射性核種の金属キレートを含んで成る請求項20に記載の方法。

22. 前記非標的細胞を、非標的細胞の増殖を増強する物質と更に接触させる請求項16又は20に記載の方法。

12. 前記感作剤がミソニダゾールであり、そして前記細胞障害剤が放射線である請求項9に記載の方法。

13. 前記感作剤がWR2721又はその誘導体であり、そして前記細胞障害剤が標的細胞に特異的な抗体又はその断片に結合した放射性核種である請求項9に記載の方法。

14. 前記感作剤が標的細胞に特異的な抗体又はその断片に結合している、請求項13に記載の方法。

15. 前記感作剤及び細胞障害剤が異なる抗体種に結合しており、この各抗体種が標的部位の異種のエピトープと反応性があり且つ各抗体種の交差反応性のパターンが重複しない請求項7に記載の方法。

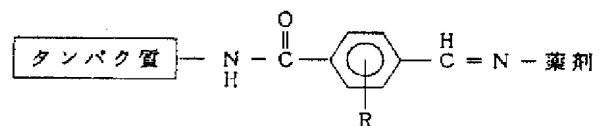
16. 非標的細胞が細胞障害剤に暴露する前又は暴露するのと同時に、非標的細胞に結合する標的指向タンパク質に結合している保護剤を含んで成る複合体に前記非標的細胞を接触させることを含んで成る、非標的細胞に対する細胞障害剤の細胞

23. 前記物質が骨髓に存在する非標的細胞の増殖を増強する請求項22に記載の方法。

24. 前記物質が、コロニー刺激因子である請求項23に記載の方法。

25. 標的タンパク質に結合した薬剤WR2721又はその誘導体を含んで成る複合体。

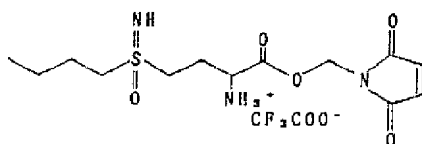
26. 前記複合体が式：



(式中、Rはベンゼン環上にある一種以上の任意の電子吸引基である)で表されるものである請求項25に記載の複合体。

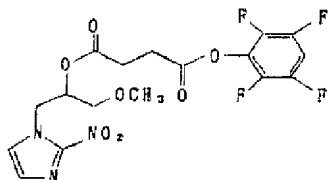
27. 前記標的指向タンパク質が、モノクローナル抗体又はその断片である請求項25又は26に記載の方法。

28. 式：



で表されることを特徴とする、タンパク質に結合させるためのブチオニンスルホキシミン誘導体。

29. 式：



で表されることを特徴とする、タンパク質に結合させるためのミソニダゾール誘導体。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、腫瘍細胞等の標的細胞に特異的に感作剤(sensitizing agent)を作用させる方法に関する。これらの感作剤は、感作剤の投与と同時に又は

(課題を解決するための手段)

本発明によれば、開裂性リンカー等の適当なリンカーを介して、ヒト又は哺乳動物宿主内の標的細胞に特異的な抗体等の標的指向タンパク質(targeting protein)に結合した感作剤を含んで成る免疫複合体が提供される。宿主に免疫複合体を適用すると、感作剤が標的細胞に供給され、生理活性のある形態で抗体から放出される。感作剤は、該感作剤を含んで成る免疫複合体の投与と同時に又はその後に投与される細胞障害剤の有効性を増強する。標的細胞は黒色腫細胞、肺癌、乳癌、又は結腸癌細胞等の癌細胞でよく、抗体は癌細胞に特異的なモノクローナルでよい。又、本発明によれば、ヒト又は哺乳動物の宿主に感作剤と細胞障害剤を投与することを含んで成るヒト又は哺乳動物の宿主内の非標的細胞に比較して標的細胞に対する細胞障害剤の細胞障害効果を特異的に増加させる方法において、前記感作剤又は細胞障害剤の少なくとも一つが標的細胞に特異的な標的指向タンパク質に結合している、ことを特徴とする方

投与の後に投与される細胞障害剤により腫瘍細胞が根絶されやすくするものである。

(従来の技術及びその課題)

種々の形態の癌を治療する方法の開発に多くの努力が向けられてきた。即ち、放射線治療法又は一種以上の薬剤、トキシン若しくは治療用タンパク質(例えば、インターロイキン-2)を用いる化学療法が開発された。又、癌細胞に対する患者の免疫応答(例えば、抗体依存性細胞性細胞障害反応)を増強する努力がなされていることも報告されている。残念ながら、現在の治療法の多くは得られる結果が種々であり、且つ患者の体内の正常細胞に治療薬が作用して生じる副作用はこれらの方法の多くに見られる。事実、正常組織に対する種々の治療薬の有害又は障害作用が、治療中の投与量制限因子となることがよくある。従って、癌に対してより効果的な療法、特に、患者体内の非腫瘍組織に対する療法薬の作用により生じる副作用を最少限にする治療を行う必要がある。

法が提供される。感作剤又は細胞障害剤の生物活性が免疫複合体からの放出により増強される場合に感作剤又は細胞障害剤と抗体との間の結合が標的部位で開裂することが好ましい。更に、癌の治療法も提供される。

第1図は、感作剤であるブチオニンスルホキシミンを抗体に結合させるための合成スキームであり、

第2図は、感作剤であるミソニダゾールを抗体に結合させるための合成スキームである。

本発明により、非標的組織と比較して、特定の種類の標的組織に対する細胞障害剤の作用を選択的増強する方法が提供される。

本発明の方法は、哺乳動物又はヒトの宿主に感作剤及び細胞障害剤を投与することを含んで成り、前記感作剤もしくは細胞障害剤又はそれらの両方を生体内でのある種の標的部位に対して特異的なタンパク質(抗体等)に結合せしめることを特徴としている。このような標的部位の例としては、特に黒色腫、肺癌、乳癌又は結腸癌を含む癌部位

が挙げられる。

感作剤は、細胞を根絶する際に細胞障害剤の有効性を増強する薬剤である。一般に、感作剤は、修復を不可能にしたり又は細胞障害剤によって生じる第二障害に耐えることのできないように細胞に作用するが、それ自体は細胞障害剤としては機能しない。従って、治療中に感作剤と細胞障害剤の両方に接触した細胞は、二種類の薬剤のうちの一種だけと接触した細胞よりも破壊されやすい。輸送機構の妨害、酵素系の誘導若しくは抑制又は細胞修復機構の妨害等、感作剤が細胞を有害分子の影響を受け易するには多種多様の機構があると思われる。感作剤を用いた場合に生じる問題としては、今まで、悪性組織に対する感度が上昇するが正常組織に対する毒性も増加してしまうことが報告されている。

一定の細胞障害剤の有効性を増強する感作剤として機能する多数の化合物が知られている。例えば、インポートアント アドバンシス イン オンコロジー1986(Important Advances in Oncology

1986)、デビタ(DeVita)等、編集者、ジェイ ビー リッピンコット(J.B.Lippincott Co.)、フィラデルフィア、146~157(1986)には、生体内で薬剤耐性腫瘍細胞株を一定の薬剤(例えば、ブチオニンスルホキシミン又はベラパミル等のカルシウムチャンネルブロッカー)と接触させて一定の細胞障害剤に対する細胞の感受性を回復させることが報告されている。又、米国特許大 4,628,047号には、薬剤のジルチアゼムを使用して、ドキソルビシン、ダウノルビシン及びビンクリスチン等のピンカアルカロイド等の抗腫瘍薬の治療活性を増強することが記載されている。更に、メトロニダゾール、ミソニダゾール、ある種の2-スルファミル-6-ニトロ安息香酸誘導体[例えば、2-(置換スルファミル)-6-ニトロベンゾエート又は2-(置換スルファミル)-6-ニトロベンズアミド)、3-ニトロピラジンの2,6-二置換誘導体及びある種のイソインドレジオン化合物が治療用放射線の感作剤として機能することが報告されている(米国特許第 4,647,588、第

4,654,369号、4,609,659号及び第 4,494,547号参照)。

DNA修復を阻害する薬剤(例えば、カンプトセチン及びエトポシド)を感作剤として使用することができる。本発明の一実施態様においては、DNA修復阻害剤が、細胞障害剤としての放射線標識抗体に結合した感作剤として使用される。

感作剤として機能することのできる他の薬剤としては、薬剤S-2-(3-アミノプロピルアミノ)エチルホスホチオニックアシッド(WR2721として知られている)及びその類似体が挙げられる。この薬剤WR2721は、式 $H_2N-(CH_2)_3-NH-(CH_2)_2-SPO_3H_2$ で表される。

WR2721及びその類似体は、放射線の作用から兵士を保護するために開発された。これらの薬剤は、癌治療中に正常組織を保護するのに使用される公知の「保護剤」である。癌患者においては、WR2721が、アルキル化剤及びシス白金等のある種の化学療法薬剤から骨髄及び他の臓器を保護する場合があることが認められている。従って、これ

らの薬剤の投与量を増加することができる。又、WR2721は、外部ビーム放射療法において正常組織をある程度保護できる場合もある。保護剤としてWR2721を使用することは、グローバ(Glover)等[ジェイ オブ クリニカル オンコロジー(J.of Clinical Oncology)、第4巻、第4号、1986年4月、第584~588頁)及びノリ(Nori)等(キャンサー インベスティゲーション(Cancer Investigation)、第2巻、第4号、1984年、第321~330号)に記載されている。腫瘍感受性に対する影響は無視できる程度か又は恐らく逆に正常臓器を保護しながら腫瘍を感作するものと思われる。従って、根絶すべき腫瘍の種類等の因子によって異なるが、WR2721は放射線及びある種の細胞障害剤の感作剤として機能することができる。

薬剤WR2721は正常組織により選択的に吸収されるのに対して、固形腫瘍組織はこの薬剤を比較的少量しか吸収しないと思われる。親水性のより小さいWR2721のある種の誘導体は、より容易に腫瘍細胞膜と交叉する(グローバ等、同書、第585頁

ージ参照)。薬剤を感作剤として使用する場合には、これらの親水性のより小さい誘導体を使用するのが有利である。更に、WR2721又はその誘導体を腫瘍特異標的タンパク質に結合させることにより、薬剤が感作剤として機能する場合に、薬剤の腫瘍細胞への吸収を増強することができる。

WR2721及びその類似体は、抗体又は他の標的指向タンパク質の複合体及び細胞を完全に損傷させることのできる放射性物質で患者を治療する前に、独立した薬剤として投与することができる。特定の部位に照射する外部ビーム照射とは異なり、WR2721が正常組織の局部的部位を保護できる場合には、標識指向タンパク質複合体の形態の放射能を循環することにより、放射線が体全体及び全ての正常臓器にそれらの部位での相対的蓄積によって異なる量で作用する。外部ビーム照射と比較して、静脈内投与放射線の線量率(dose rate)は非常に低い。更に、線量は投与後経時的に変化する。外部ビーム照射では、高い一定線量率で腫瘍及び正常組織に作用する。局部的で高い一定の線量率

の外部ビーム照射は、放射線標識抗体又は他の標的剤により生じる放射線が一般的に1時間～2週間(放射線標識複合体の半減期、放射線標識複合体のクリアランス速度等によって異なる)連続的に患者に照射される静脈投与による内部低線量率照射とは非常に異なる。WR2721は、独立した薬剤として、静脈注射により、200mg～2g/ml、好ましくは0.5～1g/mlの投与量で投与することができ、その後直ちに放射線標識抗体を注射する。又、WR2721は、放射性同位体の半減期及び放射線標識抗体又はその断片によって異なるが、後で投与して骨髄及び正常組織の保護を高めることもできる。

又、WR2721等の保護剤を、非標的組織に結合する一種以上の標的指向タンパク質に結合させて、この薬剤が細胞障害剤から非標的組織を保護するように供給されるようにしてもよい。例えば、WR2721を骨髄幹細胞に結合する抗体に結合させて、骨髄幹細胞を標的としてもよい。WR2721を独立した形態で投与したとき、腫瘍耐性が増加し且つこ

の耐性が腫瘍ごとに異なる場合には、WR2721の標的を骨髄幹細胞とすると、腫瘍の放射線に対する感受性を維持したまま骨髄を保護することができる。

又、WR2721を独立した薬剤として投与する代わりに、腫瘍特異的標的指向タンパク質に結合させてもよい。このような複合体は、薬剤が治療すべき特定の種類の腫瘍及び投与すべき細胞障害剤に対して感作剤として機能する場合に使用するのが有利である。

WR2721及びその類似体の別の用途は、標的指向タンパク質と交叉反応したりあるいは複合体を非特異的に蓄積する非標的臓器に対する、トキシン及び抗体、その断片又は他の標的タンパク質の薬剤複合体の毒性を減少させることである。例えば、WR2721又はその類似体は、シェードモナス属エンドトキシン-抗体複合体の肝毒性を減少することができる。

保護剤を投与すると非標的組織の損傷は減少するが、一般的には、非標的(正常)細胞の破壊は

完全にはなくなる。従って、患者には、更に、一種以上の非標的細胞の増殖を増強する物質を投与することが望ましい。このような物質としては、骨髄内の細胞の増殖を刺激するコロニー刺激因子(CSF)が挙げられるが、これらのものには限定されない。これらの物質としては、赤血球細胞に作用するエリスロポイエチン、顆粒球-CSF及び顆粒球-マクロファージ-CSFが挙げられる。

更に、一定の状況下で細胞障害効果を示す薬剤の中には、一定の細胞障害剤と結合して投与する場合に感作剤として使用することができるものがある。例えば、高い投与量で細胞障害効果を示す特定の薬剤は、比較的低い投与量で投与すると感作剤として効果があることがある。従って、これらの薬剤は、効果的な細胞障害作用を及ぼすのに必要とされるよりも少なく且つ感作剤と一緒に又はその後投与される細胞障害剤の有効性を増強するに十分な投与量で投与することができる。このようなことから、感作剤の定義には投与量を

含める場合がある。これは、高い投与量では、一定の感作剤（全てではない）は細胞障害剤として機能することができるからである。一定の細胞障害剤を高い投与量で投与する場合に生じる問題は、これらの薬剤を感作剤として低投与量で使用するにより改善できる。高い投与量で細胞障害効果を示すが本発明において感作剤として使用できる薬剤は数多くあるが、それらの一例としては、ドキソルビシン、ブレオマイシン、及びシスージアミノジクロロ白金（シスプラチン）等の白金化合物が挙げられる。

患者の標的細胞に対して致死効果を示す細胞障害剤あって、一種以上の感作剤により致死効果が増強される多数の細胞障害剤を本発明の方法に使用することができる。これらの細胞障害剤としては、例えば、放射線（放射線療法が内部投与であるか又は外部手段による投与であるかは無関係に）及び細胞障害剤が挙げられる。このような数多くの薬剤としては、例えば、Ｌ－フェニルアラニンナイトロジェンマスタード（メルファラン）

等のナイトロジェンマスタード、ダウノルビシン及びドキソルビシン等のアントラサイクリン抗生物質、シスージアミノジクロロ白金（シスプラチン）等の白金化合物、並びにビンクリスチン等のビンカアルカロイドが挙げられる。内部放出放射線としては、患者の体内に注射される療法的に有効な量の放射性同位体が挙げられる。このような放射性同位体としては、 ^{186}Re 、 ^{187}Re 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{103}Pd 、 ^{212}Bi 、 ^{203}Pb 、 ^{212}Pb 、 ^{211}At 、 ^{97}Ru 、 ^{103}Rh 、 ^{198}Au 、 ^{199}Ag 及び ^{125}I が挙げられるがこれらのものに限定されない。これらの放射性同位体は、患者に投与するときには、一般的に担体分子に結合する（例えば、キレート-抗体複合体の形態）。適当な内部放出放射線療法剤としては、例えば、ヨーロッパ特許出願公開第

188,256号に記載されているようにして抗体に結合する金属放射性核種キレートが挙げられる。又、外部手段により投与する放射線としては、コバルト療法等の外部ビーム放射が挙げられる。

感作剤は、治療すべき腫瘍及び投与する所望の

細胞障害剤の各種類等の因子に応じて選択する。例えば、一定の薬剤が上記したような治療放射線に対して細胞を感作することが報告されている。米国特許第 4,628,047号には、ジルチアゼム〔化学名：d-3-アセトキシシス-2,3-ジヒドロ-5-(2-(ジメチルアミノ)エチル)-2-(p-メトキシフェニル)-1,5-ベンゾチアゼピン-4(5H)-オン〕を用いて、ドキソルビシン及びビンカアルカロイドビンクリスチン等の細胞障害剤に対する種々の種類の癌細胞の感受性を高めることが記載されている。デビタ等（前掲）には、他の感作剤と一定の細胞障害剤との対形成とともに、異種癌細胞のこれらの薬剤治療に対する感受性の差異の推定がなされている。例えば、BSOは、細胞のグルタチオンレベルを減少することにより増強される細胞障害効果を有する薬剤の感作剤として機能すると考えられる。感作剤と細胞障害剤の更なる組み合わせは、所望の標的細胞（例えば、特定の癌細胞株）に相当する培養細胞を用いた生体外アッセイ等の方法によ

り確認できる。特定種の細胞株中のGSHレベルを低下するのにBSOが効果的であるかどうかを決定するアッセイが開発された〔キャンサートリートメントリポート(Cancer Treatment Reports)、第69巻、第11号、1293~1296(1985)〕。

本発明によれば、細胞障害剤又は感作剤の一方又はそれらの両方が標的タンパク質に結合される。標的指向タンパク質は、結合したその薬剤を生体内で所望の標的部位に放出する。このようなタンパク質としては、標的細胞上の受容体に対して特異的なものが挙げられる。本発明で使用するのに適当な標的指向タンパク質としては、ホルモン及び抗体が挙げられるが、これらのものには限定されない。抗体はポリクローナルでもモノクローナルでもよいが、標的細胞に特異的なモノクローナル抗体(MAb)が好ましい。ヒトにおける腫瘍関連抗原に特異的なMAbをはじめとする、特定の種類の細胞に結合する多数のモノクローナル抗体が開発された。このような多くのMA

bのうち、使用できるものとしては、抗TAC又は他のインターロイキン-2受容体抗体；250キロダルトンヒト黒色腫関連プロテオグリカンについては9.2.27及びNR-ML-05；37〜40キロダルトンのパンカルシノール糖タンパク質についてはNR-LU-10；並びに今までのところ同定されていない腫瘍関連抗原についてはOVG₃が挙げられる。又、遺伝子工学又はタンパク工学で誘導した抗体も用いることができる。本発明で用いられる抗体は、無傷分子、その断片又はそれらと機能的に等価のものいずれでもよい。抗体断片としては、例えば、従来の方法又は遺伝子工学若しくはタンパク工学により製造することのできるF(ab')₂、Fab'、Fab及びFv断片が挙げられる。

感作剤若しくは細胞障害剤又はそれらの両方が抗体に結合されるかどうかとは無関係に、所望の標的細胞だけが両方の種類の薬剤に暴露され、それにより、非標的組織よりも根絶され易くなる。感作剤だけを標的特定の抗体に結合させるとき、標的及び非標的細胞が、患者に投与される細胞障

害剤に暴露されるが、標的細胞だけが感作剤と細胞障害剤の両方に暴露される。一方、細胞障害剤だけを抗体に結合させる場合、標的細胞及び非標的細胞が感作剤に暴露されるが、標的細胞だけが両方の種類の薬剤に暴露される。又、両方の種類の薬剤が抗体に結合されると、標的細胞だけが薬剤に暴露される。

両方の種類の薬剤を抗体に結合する場合、所望の標的細胞に結合する異種の抗体（例えば、標的細胞について異種のエピトープを認識する抗体）に結合してもよい。例えば、MAb9.2.27〔モルガン(Morgan)等、ハイブリドーマ(Hybridoma)、1、17(1981)〕及びNR-ML-05〔「エンハンストプロダクションオブエンタイボディーズユーティライジングインソリュビライズドイミューンコンプレックス(Enhanced Production of Antibodies Utilizing Insolubilized Immune Complexes)」と題する同時継続米国特許出願第024,632号〕は、250キロダルトンの黒色腫関連抗原の異種のエピトープを認識することが記載さ

れている。特定種の標的細胞についての異種のエピトープと反応する2つの抗体を単離する方法は公知である。このような方法の一つが同時継続米国特許出願第024,632号に記載されている。又、これらの2つの薬剤を、別々に同一の抗体に結合させてもよい。更に、本発明の別の実施態様では、2つの薬剤を1つの抗体と反応させて、得られる免疫複合体が同一の抗体に結合した両方の薬剤を包含するようにしてもよい。本発明の一実施態様によれば、感作剤と細胞障害剤を異なる抗体種に結合するが、この際、各抗体種は標的部位についての異なるエピトープと反応性があり、且つ各抗体種の交叉反応性のパターンは重複しない。従って、感作剤及び細胞障害剤は標的組織に付加的に蓄積するが、薬剤の一方だけが、抗体の一つが交叉反応する各種類の非標的組織に蓄積する。正常組織との交叉反応性について実質的に重複パターンを有さない抗体種の対及びそれらの利用については、更に、同日（平成1年2月27日）に出願された「機能的特定の抗体」と題する特許出願の

明細書中に記載されている。

意図する標的部位と反応性がある異種の抗体のスクリーニングを公知の免疫組織化学分析により行い、各抗体種ごとに、種々の正常組織試料との交叉反応性のパターンを測定する。免疫組織化学アッセイ法の一つが、1987年1月15日発行のセラニ(Ceriani)等、キャンサーリサーチ(Cancer Research)、47、第532〜540頁に記載されている。交叉反応性について実質的に重複しないパターンを有する2つの抗体種（即ち、機能的特定の抗体）がこれにより同定されて本発明に使用される。「交叉反応性のパターンが重複しない」とは、一つの抗体が交叉反応する非標的組織が、他の抗体種が反応する非標的組織とは完全に又は少なくとも実質的に異なることを意味する。機能的に特定の抗体を使用すると、細胞障害剤と感作剤の両方が同一の非標的組織に局在するのが最小となるか又は無くなるので有利である。

機能的に特定の抗体として使用できるモノクローナル抗体としては、TPS-2(NR-LU-10とも

称する)及び TFS-4 (NR-LU-11とも称する)が挙げられる。これらについては、バルキ(Varki)等、キャンサー リサーチ(Cancer Research)、44、681~687(1984)及び岡部等、キャンサー リサーチ(Cancer Research)、44、5273~5278(1984)に記載がある。両方の抗体が小細胞肺癌と反応する。一連の正常組織試料との交叉反応性の評価では、各抗体が更にいくつかの正常組織に結合したが、両方の抗体が反応した唯一の正常組織は甲状腺であった。

抗体の非標組織への吸収を減少させる別の方法(例えば、交叉反応性又は非特異的結合機構により)が、「メソッズ オブ インブルーブド ターゲッティング オブ エンタイボディー、エンタイボディー フラグメンツ、ホルモンズ、アンド アザー ターゲッティング エージェンツ、アンド コンジュゲーツ ゼアラオブ(Methods for Improved Targeting of Antibody, Antibody Fragments, Hormones, and other Targeting Agents, and Conjugates Thereof)」と題する同時継続米

国特許出願第 107,136号に記載されている。

従って、本発明により、患者の非標的細胞に対して標的細胞(例えば、癌細胞)の根絶を選択的に増強する方法が提供される。感作剤及び細胞障害剤の一方又は両方を所望の標的細胞に対して特異的に供給することにより、非標的(正常)細胞が薬剤の一方に(両方ではない)暴露されるか又は薬剤に暴露されないで、非標的細胞に対する毒性が減少する。このことは、正常細胞に対する治療剤の作用により生じる毒性が、現在使用されている多くの治療法に関する投与量制限因子となる場合があることからみて重要な利点である。

モノクローナル抗体が所望の標的部位に対して100%特異的であることはまれであることは公知である。例えば、一定の抗原に特異的であると言われるMAbは、一般的に、大部分は生体内で所望の標的部位に局在するけれども、ある程度の交叉反応性及び/又は非標的組織への非特異的吸収を示す。従って、ここでの抗体の特異性等の説明は、当該技術分野におけるこれらの用語に関して

理解されるものの範囲内であると解釈されるべきである。標的細胞に対してできるだけ高い特異性を有するモノクローナルを使用することが望ましい。

薬剤を抗体に結合させる手法は、薬剤の化学構造により異なる。抗体は、適当な薬剤分子の適当な官能基と反応して薬剤を結合せしめるのに有効な種々の官能基、例えば、カルボン酸(COOH)又は遊離アミン(-NH₂)基、を含有するタンパク質である。又、抗体及び/又は薬剤を誘導体にして更なる反応性官能基を露出又は結合してもよい。誘導体化では、イリノイ州のロックフォードにあるピアース化学社(Pierce Chemical Company)から入手できるような多数のリンカー分子のいずれかを結合させる(ピアースの1986~1987ゼネラルカタログ第313~354頁参照)。又、誘導体化では、抗体を化学処理(例えば、糖タンパク質抗体の糖成分を過ヨウ素酸塩を用いてグリコール開裂させて遊離アルデヒド基を発生させる)を行ってもよい。抗体の遊離アルデヒド基は、薬剤のヒドラジ

ン基と反応して、薬剤をそこに結合させる(米国特許第4,671,958号参照)。抗体又は抗体断片上に遊離のスルフィドリル基を発生させる手法(例えば、ジスルフィドを還元してチオール基を発生させることにより)も公知である(米国特許第4,659,839号参照)。遊離のチオール基は、例えば、活性化二重結合(例えば、リンカーのマレイミド基の二重結合)と反応させてチオエーテル結合を生成する。種々の化合物(放射性核種金属キレート、トキシシン及び薬剤をはじめとする)を抗体等のタンパク質に結合させるための多くの手法並びにリンカー分子は公知である。これらについては、例えば、ヨーロッパ特許出願公開第188,256号、米国特許第4,671,958号、第4,659,839号、第4,414,148号、第4,699,784号、第4,680,338号、第4,569,789号及び第4,590,071号並びにボルリングハウス(Borlinghaus)等(キャンサーリサーチ、47、第4071~4075頁、1987年8月1日発行)に記載されている。

本発明の一実施態様において、単一の抗体種を

細胞障害剤及び感作剤の両方（同時又は順番に）反応させることにより、両方の薬剤を同一の抗体分子に結合させる。2つの薬剤を抗体に結合する方法は、薬剤の化学構造により異なる。

一定の化合物を抗体に結合する方法の中には、化合物（例えば、薬剤、トキシシン等）を抗体に結合すると、化合物の生物活性が低下する問題を生じるものがある。このような化合物を安定な共有結合を介して結合させると、例えば、標的部位で、遊離した最大活性の形態で放出されることは期待できない。例えば、上記したボルリングハウス等に記載されているモノクローナル抗体に共有結合した放射線増感剤であるミソニダゾールを包含する免疫複合体では、独立した薬剤と比較してミソニダゾールの生体内活性が減少する。

従って、抗体から放出されないと薬剤の所望の生物活性（即ち、感作活性又は細胞障害活性）が減少する場合には、標的部位の近くで開裂する結合を含んで成る免疫複合体を本発明で使用するのが好ましい。この際、この薬剤は、抗体によって

標的部位に供給された後、生物活性形態で抗体から放出される。結合を開裂して感作剤又は細胞障害剤を抗体から放出するのは、酵素活性又は免疫複合体が標的細胞の内部若しくは標的部位の近くのいずれかに暴露される条件によって刺激される。標的部位が腫瘍であるとき、腫瘍部位に存在する条件下（例えば、腫瘍関連酵素若しくは酸性pHに暴露したとき）で開裂可能であるリンカーを使用することができる。多数の開裂性リンカーを既に上記で説明した。これらのリンカー基から薬剤を放出する機構には、ジスルフィド結合の還元、感光結合の照射、誘導化アミノ酸の側鎖の加水分解、血清補体媒介加水分解及び酸触媒加水分解等を伴う。1987年12月2日に出願された米国特許出願（代理人整理第6922,476号）には、特定の化学構造のリンカーを包含する免疫複合体を開示している。このリンカーは、生体内開裂され、化合物（放射線治療薬、薬剤、トキシシン等）を未変性の形態で放出する。このリンカーは、弱酸性のpHで開裂されやすく、又、標的細胞の細胞質への輸送

中に開裂することにより、標的細胞内部に生物活性化合物を放出するものと思われる。米国特許第4,671,958号には、患者の補体系のタンパク質分解酵素により生体内の標的部位で開裂するリンカーを含んで成る免疫複合体についての説明がある。他の開裂性結合系についての説明がその後の実施例にある。実施例I及びVの手法により生成する免疫複合体は、内在化される（即ち、例えば、エンドソームを介して標的細胞の細胞質に輸送される）ものと思われる。標的腫瘍細胞内の酵素は、感作剤と抗体との間の結合を開裂して、標的細胞内に感作剤を生物活性のある形態で放出する。

本発明によれば、細胞障害剤（未結合又は免疫複合形態で）の投与前又は投与と同時に感作剤（未結合又は免疫複合形態で）を患者に投与する。投与する各薬剤の量は、二種類の薬剤の組み合わせが療法的に効果があるようにする。投与量は、腫瘍の種類及び数、投与する薬剤の種類並びに一方若しくは両方の薬剤が抗体に結合しているかどうかによって異なる。

本発明の一実施態様によれば、癌の治療法が提供される。患者が罹っている種類の癌に対して効果がある細胞障害剤を、細胞障害剤が細胞障害効果を発揮するように標的癌細胞を効果的に感作する感作剤の投与と同時に又はその後投与する。感作剤及び細胞障害剤の一方又は両方が、標的癌細胞に特異的な抗体（好ましくはMAb）に結合している。標的部位で抗体から感作剤又は細胞障害剤が放出されるのが望ましい場合には、各免疫複合体は開裂性結合を含む。遊離感作剤、結合感作剤、遊離薬剤及び／又は結合薬剤の投与量及びスケジュールは、毒性、腫瘍についての抗原発現、正常組織についての標的抗原の分布並びに薬剤及び／又は感作剤に対する腫瘍及び正常交叉反応性組織の相対的感受性によって異なることは、医学的腫瘍学の当業者にとっては容易に理解されるであろう。これらのパラメータは、各系毎に、確立した手法及び分析、例えば、フェーズI、II及びIII臨床試験において決定される。

〔実施例〕

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例には限定されない。

実施例1. BSOと抗体との結合

ブチオニンスルホキシミン (BSO) は、 γ -グルタミルシステインシンセターゼを阻害し且つ細胞中のグルタチオン (GSH) を著しく減少させる合成アミノ酸である。BSOは、ニュージャージー州のサウスブレインフィールドにあるケミカルダイナミクス社 (Chemical Dynamics Corporation) から入手できる。BSOを抗体に結合するための合成図を第1図に示し、以下説明する。
N, N'-ビス(ヒートキシカルボニル)ブチオニンスルホキシミン (3) の調製

ブチオニンスルホキシミン (1) (1.6 g、5 mmol) の THF-H₂O (1 : 1、25 ml) 溶液を攪拌しながら、Et₃N (750 μ l、1.1 当量) を添加後、ジ-tert-ブチルピロカーボネート (4.5 g、4.1 当量) を添加した。得られた透明な二相混合物を15時間攪拌した。終わりに、真空中でテトラヒ

ドロフランを蒸発させた後 MeOH (15 ml)、Et₃N (750 μ l) を添加した。得られた均一溶液に、ジ-tert-ブチルピロカーボネートを8日間で滴下した (15.25 g、1.4 当量；最初の96時間では48時間当たり2当量；後半の96時間では48時間当たり5当量)。逆相TLC、MeOH-H₂O (7 : 3) では、ニンヒドリンを噴霧後加熱したところ、主に2つのスポット (R_F = 0.7 及び 0.4) が現れた。酢酸 (1 ml) を反応混合物に添加し、揮発成分を真空中で蒸発させた後、残留物を真空中でトルエンとともに蒸発させた。残留油を MeOH に溶解し、H₂O 添加してわずかに混濁させた。その後、MeOH-H₂O (3 : 7) で平衡化した C₁₈ カラムにチャージし、MeOH-H₂O (3 : 7、500 ml)、MeOH-H₂O (2 : 3、250 ml)、MeOH-H₂O (1 : 1、200 ml)、MeOH-H₂O (3 : 1、300 ml) 及び最後に MeOH (300 ml) で溶離して、75 ml の分画を集めた。N-ヒートキシカルボニルブチオニンスルホキシミン (2) を含有する分画を混合後、真空中で蒸発させて粉末の形態で 1.05 g 得た。¹H NMR (CDCl₃)

δ 8.1 (2H、D₂O と交換性、br's)、5.8 (1H、D₂O と交換性、br's)、4.3 (1H、m)、3.2 (4H、m)、2.3 (2H、m)、2.0 ~ 0.8 (16H、m)。N, N'-ビス(ヒートキシカルボニル)ブチオニンスルホキシミン (3) を含有する分画を混合後、真空中で蒸発させて、泡状体の形態で 450 mg を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 6.0 ~ 5.5 (2H、D₂O と交換性、br's)、4.40 (1H、m)、3.4 (4H、m)、2.5 ~ 2.2 (2H、m)、1.8 (2H、m)、1.48、1.45 (18H、2xs)、0.97 (3H、t、J=7Hz)。¹³C (CDCl₃) δ 176.3、158.9、156.4、80.8、80.3、51.5、51.3、48.1、48.0、28.3、28.1、27.9、25.5、24.3、24.1、21.5、13.5。

N, N'-ビス(ヒートキシカルボニル)スルホキシミン(マレイミド)メチルエステル (5) の調製

アルゴン雰囲気下の化合物 (3) (290 mg、0.7 mmol) の CH₂Cl₂ (3 ml) 溶液を 0 °C に冷却後、Et₃N (100 μ l) を添加した。10分後、イソブチルクロロホーマート (120 μ l) をシリンジで滴下した。

得られた溶液をアルゴン雰囲気下 0 °C で1時間保存した。N-ヒドロキシメチルマレイミド (4) (89 mg、0.7 mmol) の CH₂Cl₂ (2 ml) 溶液を添加し、得られた琥珀色の懸濁液を 0 °C で30分間攪拌した。TLC、シリカゲル、MeOH-CH₂Cl₂ (1 : 19) により、この時間で反応が終了したことが確認された。反応混合物を CH₂Cl₂ (15 ml) で希釈し、H₂O (10 ml) と CH₂Cl₂ との間に分配した。有機相を乾燥 (Na₂SO₄)、濾過後、真空中で蒸発させた。残留物 (370 mg) を、MeOH-CH₂Cl₂ (1 : 19) を用いて 1 × 15 cm のシリカゲルカラムでフラッシュクロマトグラフィーに附した。N, N'-ビス(ヒートキシカルボニル)ブチオニンスルホキシミン(マレイミド)-メチルエステル (5) を含有する分画を混合後、真空中で蒸発させて、淡黄色油状物 (230 mg、62%) を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 6.8、(2H、s)、5.8 (2H、m)、5.2 (1H、m)、4.3 (1H、m)、3.5 ~ 3.1 (4H、m)、1.5 ~ 2.1 (2H、m)、1.8 (2H、m)、1.48、1.45 (18H、2S)、0.95 (3H、t、J=7.0Hz)。

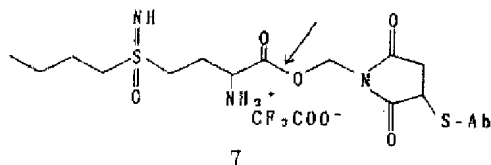
スルホキシミン(マレイミド)メチルエステルの調製

化合物〔5〕(71mg)の CH_2Cl_2 (350 μl)溶液を無水TFA(50 μl)で処理した。得られた淡黄色溶液を室温で一晩保存した。TLC、シルカゲル、 $\text{MeOH}-\text{CHCl}_3$ (1:9)及び $n-\text{BuOH}-\text{AcOH}-\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1)により、反応の終了を確認した。その後、揮発成分を蒸発させた。得られた粗生成物を、 Et_2O (2×5mg)と共にすりつぶし、洗液を捨てた。残留物の ^1H NMRは δ 6.8(2H, s)、5.6(2H, m)、4.6(1H, H_2O のピーク下に部分的に埋まっている)、3.6~3.2(4H, m)、2.4~2.2(2H, m)、1.8~1.5(2H, m)、1.4~1.2(2H, m)、0.8(3H, t, $J=7.0\text{Hz}$)。この結果は意図する構造と一致する。

B SO誘導体〔6〕を、腫瘍関連抗原を認識するモノクローナル抗体に結合する。このような抗体の一つは、黒色腫に存在する250kbの糖タンパク質/プロテオグリカン抗原を認識するNR-LU-05である。他の例としては、肺癌、結腸癌及び乳

癌に存在する40kbの糖タンパク質を認識するNR-LU-10が挙げられる。第三に、小細胞肺癌と反応し、上記したように「機能的特異性抗体」としてNR-LU-10と一緒に用いることができるNR-LU-11が挙げられる。B SO誘導体のマレイミド基は、抗体の遊離スルフヒドリルと反応し免疫複合体を生成する。一般的な反応操作は、米国特許第4,659,839号に記載されている。本発明の一実施態様において、反応操作を、Fab'断片を抗体から分離することから始める。これは従来の手法、例えば、まず抗体をババインで処理して F(ab')_2 断片を作る(パーハム(Parham)等、ジェイ イムノル メソッズ(J. Immunol. Methods)、53、133~173(1982))。この F(ab')_2 断片を、ジチオトレイトール、2-メルカプトエタノール又はシステイン等の還元剤で穏やかな還元条件下で処理して、重鎖と軽鎖との間のジスルフィド結合を破壊することなく2つの重鎖間の単一ジスルフィド結合を選択的に開裂する。得られる2つのFab'断片は、各々、少なくとも1つの遊離スルフヒドリル基を

有している。これらのFab'断片を誘導化B SO化合物と、適当な緩衝溶液中で、抗体断片が損傷しないような条件下で反応させる。適当な緩衝液としては、リン酸ナトリウム緩衝液、食塩加リン酸緩衝液及び炭酸ナトリウム緩衝液等の非毒性緩衝液が挙げられ、濃度が約1.0MでpHが約7.0のものが好ましい。得られる免疫複合体は次式〔7〕



(式中、Abは抗体断片を示す)で表される。

この免疫複合体は、標的細胞内部のエステラーゼにより、矢印で示した結合部で開裂すると思われる。薬剤のカルボキシル基が放出後に再生されることから、B SOが未変性の遊離形態で細胞内部に放出される。

実施例2 感作剤・抗体複合体の生体外アッセイ

抗体により標的細胞に供給されるときB SO

の感作剤としての有効性を、生体外アッセイで評価する。過剰のNR-LU-10-B SO複合体をヒト肺癌細胞株とともに4~72時間インキュベートする。細胞障害剤であるドキソルビシンを培養液に、段階的に減少させた濃度(1、10、100ng/ml及び1、10、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で添加し1~24時間保つ。NR-LU-10-B SOであらかじめ処理しない対照培養液及び未結合NR-LU-10で処理したもう一つの対照をも、同様の濃度でドキソルビシンとともにインキュベートした。NR-LU-10-B SOで前処理した細胞は対照よりも、ドキソルビシンに対して感受性が高い。又、抗原陰性(即ち、非標的)細胞は、ドキソルビシンにより死滅率は増加しない。

実施例3 腫瘍治療におけるB SO・抗体複合体の利用

抗体により認識される腫瘍患者にB SO・抗体複合体を投与する。適当な間隔を置いて、ドキソルビシンを全身投与する。患者の腫瘍細胞は、B SO・抗体治療を行わない場合よりも、選択的

にドキソルビシンに対する感受性が高まる。

1987年10月9日に出願した同時継続特許出願（整理第6922,450号CIP）に記載の方法に準じて、生体内の交叉反応部位へのNR-LU-10-BSOの結合を減少させるために未結合NR-LU-10（7.5 mg）を予備注射後、実施例1に記載した方法により調製したNR-LU-10-BSO複合体を小細胞肺癌（SCLC）患者に投与した。局在化、内在化及びグルチオンレベルの減少のために適当な期間を置いた後、ドキソルビシンを注入する。感作剤としてNR-LU-10-BSO複合体を投与しないSCLC患者と比較して、標的（癌）細胞の根絶化が増強される。

実施例4 細胞障害剤を含有する免疫複合体の使用

遊離薬剤の代わりにドキソルビシン-NR-LU-10複合体を用いること以外は実施例2及び3と同様の操作を繰り返す。適当なリンカー又は化学反応法を用いて、ドキソルビシンを抗体に結合させる。例えば、米国特許第4,680,388号又は4,263,279号に記載の手法を用いてもよい。知る

限りにおいては、NR-LU-10（感作剤が結合している）及びNR-LU-11は甲状腺を除いて同様な正常組織のいずれとも交叉反応しないので、ドキソルビシンNR-LU-11を用いることが好ましい。このように、感作剤と細胞障害剤の両方が交叉反応を介して同一の正常細胞に供給されることが最少限に抑えられる。細胞障害剤に対する抗原陽性細胞の感受性が増強されるので、生体外の抗原陽性細胞及び生体内の腫瘍が、非標的細胞に比較して選択的に根絶される。

実施例5 開裂性リンカーを介してミソニダゾールを抗体に結合させる合成スキーム

感作剤であるミソニダゾールを、第2図の合成スキームに準じて、次のようにして抗体に結合させる。

ミソニダゾール（*tert*-ブトキシカルボニル）ブチラート（2）

ミソニダゾール（1）（1 mmol）のジメチルホルムアミド溶液5 mlに、琥珀酸モノ-*tert*-ブチルエーテル1 mmolのジメチルホルムアミド溶液

5 mlを添加後、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド1.1 mmolを添加する。混合物を一晩室温で攪拌後、沈殿した固体を濾過し、濾液を蒸発した。残留物を酢酸エチルに溶解し、水及び5%重炭酸塩で順次洗浄する。真空下で酢酸エチルを除去後、生成物をシリカゲルカラムを用いてフラッシュクロマトグラフィーにより精製する。

ミソニダゾール（*tert*-カルボキシ）ブチラート（3）

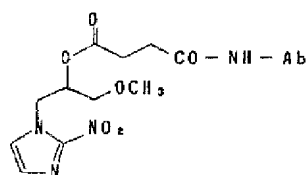
上記ブチルエステル（2）（1 mmol）の無水トリフルオロ酢酸5 ml溶液を、室温で5～6時間攪拌後、反応混合物を薄層クロマトグラフィーに附する。溶媒を蒸発除去し、生成物をエーテルで倍散して単離する。次の工程に進む前に、トリフルオロ酢酸塩を真空中で一晩乾燥する。

ミソニダゾール（*tert*-2, 3, 4, 5-テトラフルオロフェノキシカルボニル）ブチラート（4）

上記酸（3）（1 mmol）の無水ジメチルホルムアミド溶液5 mlに、N-メチルモルホリンを添加後、溶液を0～5℃に冷却する。この溶液に、

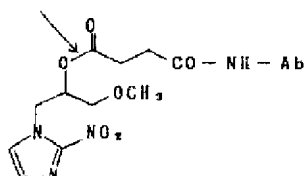
イソブチルクロロホーマート（1 mmol）を添加後、30分間攪拌する。あらかじめ0～5℃に冷却した2, 3, 5, 6-テトラフルオロフェノール溶液（ジメチルホルムアミド2 mlに1 mmol溶解したもの）を、5～10分間で滴下する。この温度で約1時間維持した後、混合物を周囲温度とする。真空中で溶媒を除去し、残留物を酢酸エチル（10～15 mmol）に溶解後、水で洗浄する。溶媒を除去後、生成物を、シリカゲルカラムを用いてフラッシュクロマトグラフィーにより単離する。標準相カラムにおける液体クロマトグラフィーにより最終的な精製を行う。抗体が損傷しないようにして、生理学的に許容される条件下で、ミソニダゾール誘導体（4）を抗体と混合する。その結果、ミソニダゾール誘導体のテトラフルオロフェニルエステル基が抗体のリジン残基の遊離アミン基と反応し、アミド結合を形成することにより、免疫複合体を生成する。反応条件は、一般的に実施例1に記載した通りである。

得られる免疫複合体は式（5）



(式中、Abは抗体を示す)で表される。

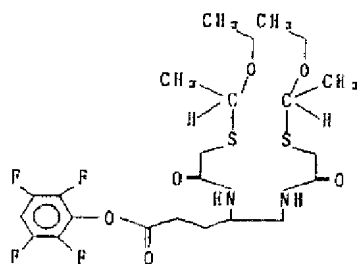
細胞間エステラーゼにより、矢印で示した位置で免疫複合体が開裂するものと思われる。薬剤のヒドロキシル基が再生されるので、ミソニダゾールは未変性遊離形態で標的細胞内に放出される。



実施例6 放射線療法と組み合わされた癌作剤としてのミソニダゾールの使用

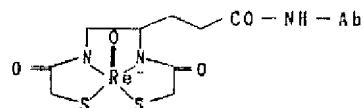
細胞障害剤としてドキソルビシンの代わりに

混合後、室温で10分間培養して¹⁸⁸Re-サイトレート交換複合体を生成した。次に、イソプロピルアルコール0.50mlを、エトキシエチルサルファー保護基及び式：



で表される2,3,5,6-テトラフルオロフェニルエステル基を含有するジアミドジメルカプチドキレート化合物である2,3,5,6-テトラフルオロフェニル-4,5-ビス〔S-(1-エトキシエチル)チオアセタミド〕ペンタノエート0.50mgを入れた別のバイアルに添加した。このバイアルを2分間攪拌してキレート化合物を完全に溶解した次に、この溶液0.30mlを、上記で調製した¹⁸⁸Re-サイトレート複合体の入ったバイアル

¹⁸⁸Reを使用する以外は実施例5に準じて調製したミソニダゾール-NR-ML-05免疫複合体を、生体外アッセイに使用し且つ上記実施例2及び3と同様にして黒色腫患者に投与する。金属放射性核種は、¹⁸⁸Reキレート-抗体断片複合体で、構造式：



(式中、Abは抗体断片を示す)で表される。

この¹⁸⁸Re含有免疫複合体は、ヨーロッパ特許出願公開第188,256号又は同時継続米国特許出願第065,011号に記載されている方法により調製される。ナトリウムパーヘネート(sodium perhenate)

(13ml、15mCi、W-188/Re-188研究規模の発生器で製造)を、クエン酸75mg、塩化第一錫0.75mg、ゲンチシン酸0.25mg及びラクトース100mgを含有する凍結乾燥混合物を入れたバイアルに添加した。バイアルを緩やかに攪拌して内容物を

に移した。緩やかに混合後、バイアルを75℃±2℃の水浴で15分間培養後、直ちに0℃の水浴に移して2分間置いた。そのときの¹⁸⁸Re標識キレートの収率は、逆相C₁₈HPLC分析で測定したところ75%と90%との間であった。

C₁₈逆相低圧材料を入れたカラム(ベーカー(Baker)C₁₈カートリッジ)を使用して¹⁸⁸Re標識キレートを次のようにして精製した。カートリッジをエタノールでコンディショニングした後、試料を装入し、2mlの水3回洗浄後、2mlの20%エタノール/0.01Mリン酸緩衝液で3回洗浄した。次に、カラムを真空中で乾燥し、1mlのアセトニトリルで2回溶離した。その結果、¹⁸⁸Re放射能の約75%が、エステルキレート化合物として95%を超える純度で回収された。その後、有機溶媒を不活性ガス流下で蒸発させた。

次に、キレートを、9.2.27(上記した)と称する抗黒色腫モノクローナル抗体のFab断片に結合する。このFab断片は、従来の手法によるバイン処理により調製される。抗体断片の緩衝液

(5 mg/ml、0.5 ml)を精製 ^{186}Re 標識キレートに添加後、0.5 M炭酸水素塩緩衝液 (pH9.50) 0.5 mlを添加する。室温に維持して15分間反応させた後、レーリジン (0.1 ml) 25 mgを添加し、反応を室温で更に15分間継続する。その結果、キレートのテトラフルオロフェニルエステル基が抗体断片の遊離アミン基と反応してアミド結合を形成する。

セファデックス G-25を充填したカラムを用いて、 ^{186}Re 標識免疫複合体を次のようにして精製する。反応混合物をカラムの頂部から装入し、PBS緩衝液を用いて1.2 mlアリコットを集めて反応バイアルを洗浄し且つ第三及び第四分画で ^{186}Re 免疫複合体を分離する。

次に、免疫複合体を更にPBSで希釈し、黒色腫患者に注射する前に放射能を測定する。細胞障害放射性同位体を含有する免疫複合体を注射する前に、ミソニダゾール-NR-HL-05免疫複合体を感作剤として投与する。次に、 $^{186}\text{Re}-\text{N}_2\text{S}_2$ キレート-9.2.27免疫複合体を、最大許容投与量で投

与する。ミソニダゾール感作剤は、黒色腫破壊に関する放射性同位体の有効性を増強する。正常細胞に対する毒性は、感作剤と金属放射性核種を標的黒色腫細胞に対して選択的に放出する免疫複合体を使用するので減少する。

実施例7 WR2721の使用による骨髄及び他の正常臓器の放射線標識抗体の作用からの保護

結腸癌患者にWR2721を静脈注射により投与する。投与量は0.2～2 g/mlであるが、0.5～1 g/mlの範囲が好ましい。薬剤を1回だけか、1日1回か又は1日数回投与して、腫瘍の感受性を維持したまま骨髄を最もよく保護するようにする。

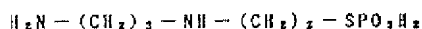
癌胎児抗原 (CEA) の変異体と反応するマウスのモノクローナルであるNR-Co-02を、ババインで消化し、そしてイオン交換クロマトグラフィーでF(ab')₂断片を単離した。実施例6で述べた方法により、 ^{186}Re 標識 N_2S_2 キレートを抗体断片に結合して、抗体断片をレニウム-186で標識する。NR-Co-02/レニウム-186複合体を、0～

12時間前、好ましくは0～10分前にWR2721を投与した転移性結腸癌患者に静脈注射する。 $\text{Re}-186$ の投与量は、1～500mg、好ましくは10～

200mgのNR-Co-02について50～1000mCi範囲で変えることができる。骨髄に及ぼす影響を、抹消血カウント (ヘモグロビン、白血球及び血小板カウント) により監視する。WR2721を投与した患者は、WR2721を投与せずに放射線標識抗体だけを投与した患者よりも、 $\text{Re}-186$ の一定投与量についての上記血液カウントの1つ、2つ又は3つにおいて減少程度が小さかった。

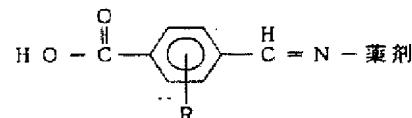
実施例8 抗体への薬剤WR2721の結合

薬剤WR2721は式：



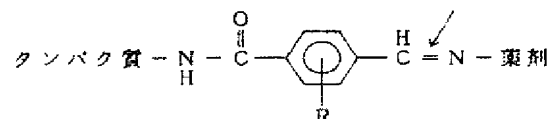
により表される。

この薬剤をp-カルボキシベンズアルデヒドと反応させて、薬剤の $-\text{NH}_2$ とp-カルボキシベンズアルデヒドのアルデヒド基との反応で生成する次式：



(式中、Rは上記したとおり)で表される誘導体を得る。

水溶性カルボジイミドカップリング剤を用いて、誘導体のカルボキシル基を、標的タンパク質のリジン残基の遊離アミン基と反応させる。得られるWR2721-標的タンパク質複合体は次式で表される。



矢印は、生体内開裂性の結合を示す。ベンゼン環の置換基Rは、任意の電子吸引基である。R基が存在すると、開裂性結合が生体内でより開裂され易くなる。適当な置換基Rとしては、F、Cl、 $-\text{NO}_2$ 及び CF_3 が挙げられるが、これらのものには限定されない。又、ベンゼン環は、一種以上の

R基を結合した状態で有していてもよい。又、このような置換基を包含するp-カルボキシベンズアルデヒドを薬剤と反応させて、置換基Rを含有するWR2721誘導体を得てもよい。

実施例9 WR2721抗体複合体の使用による細胞障害剤に付随する毒性からの骨髄の保護

WR2721/抗体複合体を用いて、TBI、及び抗体、その断片又は他の標的指向剤の放射線標識されたもの若しくは薬剤若しくは毒素との複合体をはじめとする、全身化学療法、外部ビーム放射線療法の毒性から骨髄を選択的に保護する。実施例8の手法を用いて、WR2721をNR-ST-10と称する抗体に結合する。NR-ST-10は、骨髄幹細胞と反応性のある抗体である。結腸癌患者に、この複合体を0.001~1 g/ml、好ましくは0.02~0.5 g/mlの投与量で投与する。

続いて、0~24時間後、好ましくは0~6時間後に、化学療法、外部ビーム放射線療法、放射線標識NR-Co-02（実施例7参照）、NR-Lu-10の薬剤複合体、NR-Lu-10の毒素複合体のい

くつか又は全てを患者に適用する。化学療法薬は、シスプラチン又はナイトロジェンマスタード等のアルキル化剤である。幹細胞に選択的に供給されたWR2721は、骨髄を保護する。その効果は、実施例7に記載の方法で測定できる。薬剤は抗体により選択的に骨髄幹細胞に放出されるので、腫瘍はWR2721によって影響されない。

〔発明の効果〕

上記したように、本発明によれば、細胞障害剤の投与の前又は投与と同時に感作剤を投与することにより、標的細胞に対する細胞障害剤の活性を増強することができる。又、2種類の薬剤の一方又は両方を所望の標的細胞に特異的な抗体に結合することにより、非標的細胞に比較して、標的細胞に対する細胞障害効果を増強することができる。更に、感作剤及び/又は細胞障害剤を、癌細胞に特異的なモノクローナル抗体に結合することにより、正常組織に対する毒性を最小にした状態で癌細胞を選択的に根絶することができる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は感作剤であるブチオニンスルホキシミンを抗体に結合させるための合成スキームであり、第2図は感作剤であるミソナグゾールを抗体に結合させるための合成スキームである。

図面の浄書(内容に変更なし)

特許出願人

ネオルックス コーポレーション

特許出願代理人

弁理士	青	木	朗
弁理士	石	田	敬
弁理士	福	本	積
弁理士	山	口	昭之
弁理士	西	山	雅也

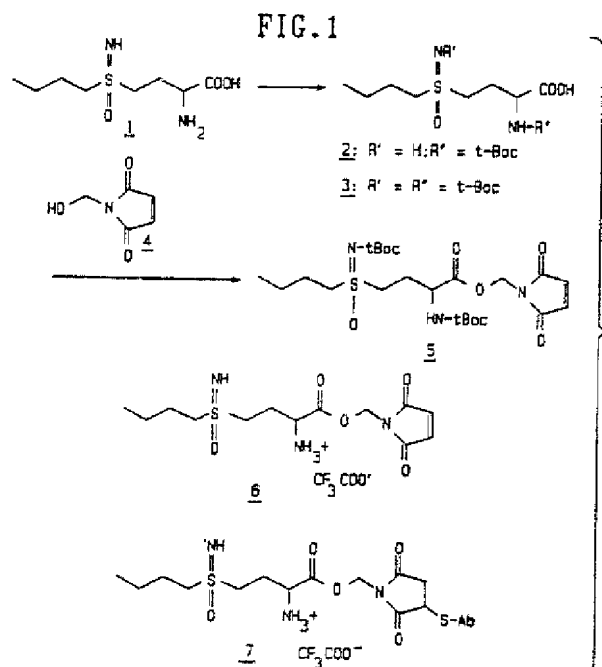
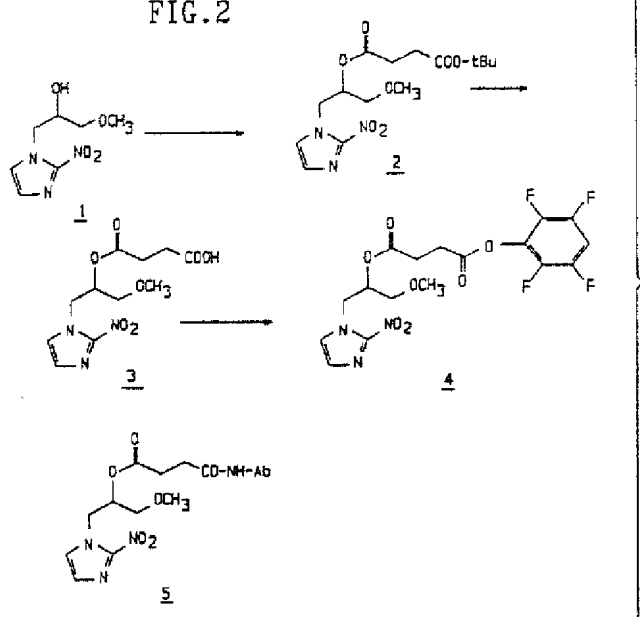


FIG.2



第1頁の続き

⑤Int. Cl.³

A 61 K 45/00
C 07 D 207/452
233/91
C 07 K 15/28

識別記号

ADU

序内整理番号

8829-4C
6742-4C
7624-4C
8318-4H

優先権主張 ⑥1988年4月4日⑧米国(U S)⑨176851

⑦発明者

アナンサチヤリ スリ
ニバサン

アメリカ合衆国, ワシントン98033, カーランド, ワン
ハンドレッドナインス アベニュー ノース イースト
11420

⑧発明者

ビベカナンダ エム.
ブルドフラ

アメリカ合衆国, ワシントン98043, エドモンズ, ファイフ
ティース プレイス ダブリュ. 15207

手 続 補 正 書 (方式)

平成 1 年 6 月 29 日

特許庁長官 吉 田 文 毅 殿

1. 事件の表示

平成 1 年特許願第 4 6 3 9 2 号

2. 発明の名称

効果が増強された細胞障害剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ネオルックス コーポレイション

4. 代 理 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目 8 番 10 号

静光虎ノ門ビル、電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青 木 朗 (外 4 名) 青木 朗
弁理士
印

5. 補正命令の日付

平成 1 年 5 月 3 0 日 (発送日)

6. 補正の対象

- (1) 願書の「出願人の代表者」の欄
- (2) 委任状
- (3) 明細書
- (4) 図面

7. 補正の内容

- (1)(2) 別紙の通り
- (3) 明細書の浄書(内容に変更なし)
- (4) 図面の浄書(内容に変更なし)

8. 添附書類の目録

- (1) 訂 正 願 書 1 通
- (2) 委任状及び訳文 各 1 通
- (3) 浄 書 明 細 書 1 通
- (4) 浄 書 図 面 1 通

特許庁